여 다양한 세포들로 구성되어 있는 생쥐 난소에서 β-endorphin의 소재를 규명하기 위해 수행하였다. β-endorphin에 대한 면역조직화학적 염색이 난소내의 황체세포에서 주로 나타난 것은 이미 보고된 결과(Shaha *et al.*, 1984; LoLait *et al.*, 1985; Aleem *et al.*, 1986)와 일치하며, 본 연구에서는 배란 직후 생긴 크기가 큰 황체세포에서보다도 퇴화가 진행된 황체세포 즉 백체(corpus albicans)에서 보다 강력한 염색반응을 보여주었다. 한편 제 1 차 여포나 제 2 차 여포 그리고 large antral follicle에서는 염색반응을 보이지 않았는데 이러한 결과는 Lim *et al.* (1983)이 보고한 배양중인 양의 과립세포에서 β-endorphin이 생성된다는 사실을 고려해 볼 때, 황체화세포에서만 β-endorphin을 생성하는 것으로 추측된다. 이를 규명하기 위해서는 황체화되기 이전의 과립세포를 체외배양하면서 인위적으로 황체화과정을 유도한 후 배양시대별로 조사하는 연구가 중요하리라 사료된다.

한편 oxytocin, vasopressin, inhibin, GnRH, 등의 물질이 난소에서 생성된다는 일련의 보고(Schwartz, 1982)는 난소의 생리적 현상에 대한 새로운 고찰을 하게 하였다.

따라서 본 연구에서 보여준 생쥐 난소에서 β-endorphin이 존재한다는 사실은 난소의 주요기능인 생식세포 형성(gametogenesis)과 스테로이드 합성(steroidogenesis)에 관련하여 β-endorphin이 autocrine 혹은 paracrine하게 난소내의 생리조절기능을 담당하고 있으리라 추측된다. 또한 β-endorphin이 여포형성과정(folliculogenesis) 중에서 황체형성에 관여하고 그 내분비적기능을 조절할 가능성도 아울러 시사된다.

β-endorphin의 세포내 신호전달기작에 관해서 β-endorphin이 thymocyte에 있어서 Ca^{++}의 유입을 증가시키며(Hemmick and Bidlack, 1987), 돼지의 소뇌에서 추출된 cyclic nucleotide phosphodiesterase의 칼슘의존성-활성화를 저해한다고 알려졌다(Giedroc *et al.*, 1985). 그리고 흰쥐의 proestrus시기에 β-endorphin이 가장 많이 분비된다는 보고(Wolf *et al.*, 1986)와 난자성숙 과정에서 Ca^{++}와 cAMP의 역할(Cho *et al.*, 1974; Tsafriri and Bar-Ami, 1978)등을 고려해 볼 때, β-endorphin이 난자성숙에 간접적으로나마 영향을 줄 수 있는 난소내 국부조절인자라고 추정된다.

인용문헌

Aleem, F. A., R. A. Omar, and G. H. Eltabbkh, 1986. Immunoreactive β-endorphin in human ovaries. *Fertil. Steril.* **45**:597-551.

Blank, M. S., A. E. Panerai, and H. E. Friesen, 1979. Opioid peptides modulate luteinizing hormone secretion during sexual maturation. *Science* **203**: 1129-1131.

Cho, W. K., S. Stern, and J. D. Biggers, 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.* **187**:383-386.

Cicero, T. J., B. A. Schainker, and E. R. Meyer, 1979. Endogeneous opioids participate in the regulation of the hypothalamic-pituitary-luteinizing hormone axis and testosterone's negative feedback control of luteinizing hormone. *Endocrinology* **104**:1286-1291.

Ferule, G. E., V. Weber, and V. Helmstaedter, 1980. Corticotropin-like substances in human gastric antrum and pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**:1656-1662.

Giedorc, D. P., T. M. Keravis, J. V. Staros, N. Ling, J. N. Wells, and D. Puett, 1985. Functional properties of covalent β-endorphin peptide/calmoudulin complexes: chlorpromazine binding and phosphodiesterase activation. *Biochemistry* **24**:1203-1211.

Hemmick, L. M. and J. M. Bidlack, 1987. β-endorphin modulation of mitogen-stimulated calcium uptake by the rat thymocytes. *Life Sci.* **41**;1971-1978.

Hsu, S., L. Raine, and H. L. Fanger, 1981. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique. *J. Histochem. Cytochem.* **29**:557-580.

Ieiri, T., G. A. Campbell, and J. Meites, 1980. Effect of naloxone and morphine on the progesterone surge of prolactin and gonadotropin in the rat. *Endocrinology* **106**:1568-1570.

Larson L-I., 1981. Adrenocorticotropin-like and α-melanotropin-like peptides in a subpopulation of human gastrin cell granules: bioassay, immunoassay and immunocytochemical evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:2990-2994.

Lee, V. W. K., J. M. McMaster, H. Quigg, J. Findlay, and L. Leversha, 1981. Ovarian and peripheral blood inhibin concentrations increase with gonadotropin treatment in immature rats. *Endocrinology* **108**:2403-2405.

Lim, A. T., S. J. Lolait, J. W. Barlow, O. W. Sum, I. Zois, B. H. Toh, and J. W. Inder, 1983. Immunoreactive β-endorphin in the sheep ovary. *Nature* **303:**709-711.

Liotta, A. S., C. Loudes, J. F. Mckelvy, and D. T. Krieger, 1980a. Biosynthesis of precursor corticotropin/endorphin-, corticotropin-, α-melanotropin-, β-lipotropin-, and β-endorphin-like material by cultured neonatal rat hypothalamic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77:**1880-1884.

Liotta, A. S. and D. T. Krieger, 1980b. In vitro biosynthesis and comparative posttranslational processing of immunoreactive precursor corticotropin/β-endorphin by human placental and pituitary cells. *Endocrinology* **106:**1504-1511.

Lolait, S. J., D. J. Autelitano, A. T. W. Lim, A. I. Smith, B. H. Toh, and J. W. Funder, 985. Ovarian immunoreactive β-endorphin and estrous cycle in the rat. *Endocrinology* **117:**161-168.

O'Byrne, E. M., J. F. Flitcrafts, W. K. Sawyer, J. Hochman, J. Weiss, and B. G. Steinetz, 1978. Relaxin bioactivity and immunoactivity in human corpora lutea. *Endocrinology* **102:**1641-1644.

Park, Y., B. J. Lee, K. Kim, and W. K. Cho, 1988. Identification of GnRh mRNA in the rat gonad. *The 8th International Congress of Endocrinology*, Kyoto, Japan, Abst. No. 03-19-048.

Rasmussen, D. D., K. H. Liu, P. L. Wolf, and S. S. C. Yen, 1983. Endogeneous opiod regulation of gonadotropin-releasing hormone release from the human fetal hypothalamus *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **57:**881-884.

Schwartz, N. B., 1982. Novel peptides in ovarian fluid: implications for contraceptive development. *Res. Front. Fertil, Regul.* **2:**1-13.

Shaha, C., A. Margioris, A. S. Liotta, D. T. Krieger, and C. W. Bardin, 1984. Demonstration of immunoreactive β-endorphin and γ3-melanocyte-stimulating hormone-related peptides in the ovaries of neonatal, cyclic and pregnant mice. *Endocrinology* **115:**378-384.

Sylvester, P. W., C. A. Van Vugut, E. A. Aylsworth, E. A. Hanson, and J. Meites, 1982. Effect of morphine and naloxone on inhibition by ovarian hormone of pulsatile release of LH in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology.* **34:**269-273.

Tsafriri, A., and S. Bar-Ami, 1978. Role of divalent cations in the resumption of the meiosis of rat oocytes. *J. Exp. Zool.* **205:**293-300.

Wathes, D. C., and R. W. Swann, 1982. Is oxytocin an ovarianb hormone? *Nature* **297:**225-227.

Wathes, D. C., R. W. Swann, S. D. birkett, D. G. Porter, and B. T. Pickering, 1983. Characterization of oxytocin, vasopressin and neurophysin from the bovine corpus luteum. *Endocrinology* **113;**693-698.

Wilkes, M. N. and S. S. C. Yen, 1981. augmentation by naloxone of efflux of LRF from superfused medial basal hypothalamus. *Life Sci.* **28:**2355-2359.

Wolf, R., A. Meiner-Fleitmann, E. M. Duker, and W. Wuttke, 1986. Intra-ovarian secretion of catecholamines, oxytocin, beta-endorphin and gamma-amino-butyric-acid in freely moving rats: development of a push-pull tubing method. *Biol. Reprod.* **35:**599-607.

(Accepted January 30, 1990)

Immunohistochemical Identification of β-Endorphin in the Mouse Ovary

Sa Sun Cho*, Young Ki Lee*, Kyungjin Kim*, Yong Dal Yoon**, Chung Choo Lee* and Wan Kyoo Cho (Department of Anatomy, College of Medicine and Department of Zoology*, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742; and Department of Biology**, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791)

The present study, using immunohistochemical procedure, was carried out to determine the localization of immunostainable β-endorphin cells in the mouse ovarian tissues. Mature female mice were perfused with 4% neutral buffered paraformaldehyde under anesthesia and then frozen-sections were immunostained with anti β-endorphin antiserum according to ABC technique. Immunoreactive β-endorphin was found in the luteal cells of corpus lutea, but not in the thecal cells. More strong immunostaining signals were observed in large corpus luteum, in particular, the regressing luteal cells. Primary and secondary follicles did not show any immunoreactivity of β-endorphin, but granulosa cells lining the antral cavity of large antral follicles contained immunoreactive β-endorphin.

Korean J. Zool. 33: 158-165, 1990

배양 근원세포의 분화에 따른 Calpain의 활성 및 양적 변화*

곽규봉 · 정성수 · 박혜경 · 김혜선 · 정진하 · 하두봉

서울대학교 자연과학대학 동물학과

Calpain은 Ca^{2+}-의존성 단백질 분해효소로서, 세포 골격단백질이나 근수축성 단백질을 분해하는 것으로 알려져 있다. 한편, 배양 근원세포의 분화는 세포융합이라는 뚜렷한 형태적 변화를 겪는데, 이때 근원세포의 세포막과 세포골격에 많은 변화가 일어난다고 알려져 있다. 본 실험에서는 근원세포 융합과정에서의 calpain의 역할을 알아보기 위하여 배양근원세포의 융합에 따른 calpain의 활성과 양적 변화를 조사하였다. 배양시간이 경과할 수록 calpain의 활성은 증가하여 세포융합이 왕성히 일어나고 있는 배양 60시간에 최대치를 이루었다. 또한, 닭골격근으로부터 순수분리된 calpain에 대한 항체를 만들어서 배양 근원세포의 분화에 따른 caplain의 양적 변화를 immunoblot으로 조사하여 본 결과, calpain은 배양 24시간에서 48시간 사이에 그 양이 급격히 증가하여, 세포융합이 시작되는 배양 48시간 사이에 최다량으로 존재하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 calpain의 단백질 분해활성이 세포 융합과정에 관련되어 있음을 암시해 준다.

KEY WORDS: Calpain, Myoblast, Cell fusion

Calpain은 calcium의존성 단백질 분해효소로서 세포 내에 존재하며 반드시 calcium이 존재하여야만 그 활성이 나타난다(Pontremoli and Melloni, 1986; Bond and Butler, 1987; Suzuki *et al.*, 1987). 이 효소는 분자량이 70-80 kDa정도의 catalytic subunit와 25-30 kDa의 regulatory subunit로 된 heterodimer로 발견되었으나(Pontremoli and Melloni, 1986), 닭의 골격근에서는 80 kDa의 monomer로 존재하는 것으로 알려져 있다(Ishiura *et al.*, 1978). 또한 calpain은 calcium 농도에 대한 감수성에 따라 두 종류로 나누어질 수 있는데, calpain I은 micromolar농도의 calcium에 대하여서도 그 활성이 나타나는 반면, calpain II는 millimolar 농도의 calcium이 존재하여야만 활성이 나타난다(Pontremoli and Melloni, 1986; Bond and Butler, 1987). 이러한 두 종류의 calpain은 거의 모든 조직세포에 존재하지만, 닭 골격근에서는 calpain II 한 종류만 존재한다(Ishiura *et al.*, 1978). Calpain의 세포내 기능에 대해서는 calcium 이온과 함께 그 중요성이 점차 인식되고 있으며, 이미 알려진 calpain의 기능으로는 다른 효소의 활성화(Melloni, *et al.*, 1986; Ito *et al.*, 1987; James *et al.*, 1989), 스테로이드 호르몬이나 growth factor 수용체의 분해(Bandry and Lynch, 1980; Cassel and Glaser, 1982), cytoskeletal protein의 분해(Nelson and Traub, 1982; Yoshida *et al.*, 1984), 근 수축성 단백질의 분해(Dayton *et al.*, 1976; Ishiura, 1981)등이 있다.

근원세포의 분화는 *in vitro*에서 재현될 수 있으며, 이러한 배양 근원세포의 분화는 형태적인 분화인 세포융합과 함께 각종 근수축 단백질의 합성이 시작되는 생화학적 분화가 동시에 수반되는 매우 복잡하고도 잘 조절된 과정이다(Okazaki and Holtzer, 1966; Devlin and Emerson, 1978). 또한, 근원세포가 융합하는 과정에서 세포막에 여러가지 변화 즉, fibronectin과 같은 세포 표면단

*본 연구는 1988년도 문교부 학술연구 조성비로 이루어진 것임.

백질의 소실(Chen, 1977; Furcht *et al.*, 1978), 세포막의 유동성 및 투과성 변화(Prives and Shinitzky, 1977), calcium ion의 유입(David *et al.*, 1981)과 같은 현상들이 나타나는 것으로 알려져 있다. 만일 인위적으로 이러한 변화를 막을 경우 세포융합이 억제되는 것으로 보아(Blau and Epstein, 1979; David *et al.*, 1981; Schollmeyer, 1986a; Kwak *et al.*, 1989), 근원세포의 이와같은 변화는 근원세포가 융합되는데 필수적이라고 할 수 있다.

한편, 이러한 세포표면 및 세포막 구조의 변화가 어떤 기작으로 일어나는가에 대한 연구는 최근에 많이 진행되고 있다. Metallo-endoprotease에 의한 limited proteolysis과정이 세포융합에 필수적이라는 보고(Couch and Strittmatter, 1983; 1984)는 단백질 분해효소에 의한 세포막 단백질의 소실이 세포융합과 밀접한 관계가 있음을 시사한다. 또한, 배양액 내의 calcium농도를 낮추면 세포융합이 저해되고, 다시 calcium 농도를 높이면 융합이 곧바로 재개되는 것으로 보아(Shainberg *et al.*, 1969; Wakelam and Pette, 1982) 세포융합에는 calcium에 의해서 매개되는 어떤 활성이 필수적이라는 것을 알 수 있다. 특히 세포융합 이전에 나타나는 calcium 유입현상(David *et al.*, 1981)은 세포 내에 calcium과 관련된 어떤 효소의 활성이 융합에 필요함을 시사해준다. 최근 Schollmeyer (1986a; 1986b)는 분열을 하는 근원세포에서는 calpain이 세포질 내에 균등하게 분포되어 있다가, 융합직전의 세포에서는 calpain이 세포막 근처로 모여있는 현상을 발견하였다. 또한, EGTA로 배양액 내의 calcium농도를 낮추면 이런 현상은 일어나지 않았다. 따라서 그는 근원세포가 융합하기 위해서는 calpain의 활성이 필수적이며, calpain의 세포막 근처로의 이동은 세포융합에 필요한 세포막의 일련의 변화와 밀접한 관련이 있을 것이라고 주장하였다.

본 연구에서는 근원세포의 융합과정에서의 calpain의 역할을 좀더 자세히 알아보고자 닭 성체의 골격근으로부터 calpain을 순수분리한 다음 이를 토끼에 주사하여 항체를 만들고, 이 항체를 이용하여 배양 근원세포의 분화에 따른 calpain의 양적변화를 알아봄과 동시에 근원세포의 분화에 따른 calpain활성도의 변화를 측정하였다.

재료 및 방법

Calpain의 순수분리와 항체형성

Calpain의 순수분리는 닭 성체의 골격근을 재료로 Ishiura등(1978)의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 닭 골격근 400 g을 5 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol이 들어있는 Tris완충용액(20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 완충용액 A)에서 잘게 자른 다음, Waring blender로 균질화하였다. 시료를 10,000 × g에서 1시간 동안 원심분리하여 상층액을 얻고, 1 N acetic acid를 이용하여 용액의 pH를 4.9로 낮추었다. 이 용액을 다시 10,000 × g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 얻은 다음, 완충용액 A로 이 침전물을 녹였다. 용액의 pH를 7.0으로 맞춘 다음, 미리 준비한 DEAE-cellulose 컬럼(1.5 × 10 cm)에 이 단백질 용액을 부었다. 젤에 붙지않은 단백질을 5 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.1 M NaCl이 들어있는 20 mM Tris 완충용액(pH 7.0)으로 씻어낸 다음, 0.1 M에서 0.4 M NaCl의 농도구배로 단백질들을 분획하였다. Calpain 분획의 확인은 calcium-의존성 [^{3}H]-casein의 분해도로 확인하였으며, 활성을 나타내는 분획만을 모아서 ultrafiltration (Amicon, PM 10) 방법으로 농축시켰다.

농축된 calpain을 5 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.1 M NaCl이 들어있는 20 mM Tris 완충용액(pH 7.8)(완충용액 B)으로 미리 평형시킨 Ultrogel AcA 34(1.5 × 50 cm, flow rate 5 ml / hr)를 이용하여 재차 분획하였다. Calpain 분획만을 다시 모아서 두 번째 DEAE-cellulose 컬럼크로마토그래피를 실시하였다. 두번째 DEAE-컬럼(0.7 × 10 cm)은 완충용액 B로 미리 평형시켰으며, 0.1-0.3 M NaCl의 농도구배로 분획하였다. 그림 1A는 두번째 DEAE-컬럼에서의 단백질 profile과 calcium-의존성 [^{3}H]-casein의 분해도를 나타낸 것이며, 그림 1B는 정제된 calpain의 SDS-polyacrylamide 젤 전기영동 양상이다.

정제된 calpain을 아래와 같이 토끼에 주사하여 calpain에 대한 항체를 얻었다. 200 μg의 calpain을 동일 부피의 Freund's complete adjuvant와 섞어서 토끼에 근육주사 하였다. 2주일이 경과한 다음 1주일 간격으로, 100 μg의 calpain을 동일 부피의 Freund's incomplete adjuvant와 섞어서 토끼에 피하주사 하였다. 항체에 대한 검정은 Ochterlony's double immunodiffusion과 immunoblot방법을 사용하여 수행하였다.

세포배양

부란 12일 째의 계배 흉근세포를 재료로 하여 O'Neill과 Stockdale (1972)의 방법에 따라 근원세포의 배양을 실시하였다. 0.1% trypsin을 처리하여 얻은 단세포들을 collagen이 처리된 배양기에 10분간 배양(5% CO_2, 37°C)하여 섬유 아세포를 제거한 후, 10%(v/v) 말 혈청(Gibco), 10%(v/v) 계배추출물, 1%(v/v) antibiotic/antimycotic (Sigma)이 들어있는 Eagle's minimum essential medium (MEM: 811 배양액)으로 근원세포의 농도를 5 × 10^5/ml로 맞추어 세포배양을 시작하였다. 배양 24시간에 배양액을 811 배양액에서 10%(v/v) 말 혈청, 2%(v/v) 계배추출물, 1%(v/v) antibiotic/antimycotic이 들어있는 MEM (8102 배양액)으로 갈아주었다. 배양액의 교환은 배양 24시간부터 매 48시간마다 실시하였으며, 배양조건은 37°C, 5% CO_2로 유지하였다.

Calpain Assay

Calpain의 활성도는 calcium 의존성 [^{3}H]-casein의 분해도를 측정하여 결정하였다. 즉, 15 mM β-mercaptoethanol이 들어있는 100 mM Tris-HCl (pH 8)용액에서, 30°C에서 1시간 동안 효소와 10 μg의 [^{3}H]-casein을 반응시켰다. 10%(w/v) trichloroacetic acid (TCA)로 반응을 종료시킨 다음, 원심분리하여 TCA에 가용성인 상층액의 방사선을 liquid scintillation counter로 계수하였다.

전기영동, Immunoblotting, 단백질 정량

전기영동은 Laemmli (1970)의 방법에 따라 sodium dodecyl sulfate (SDS)의 존재하에서 10%(w/v) acrylamide slab젤을 사용하여 실시하였다. 전기영동 후 단백질을 Coomassie blue R-250으로 염색하거나 nitrocellulose paper에 electrotransfer (Stott *et al.*, 1985)하였다. Calpain에 대한 항체를 처리한 후, ^{125}I-protein A와 결합시킨 다음 autoradiography를 실시하였다. 단백질 정량은 bovine serum albumin (BSA)를 표준 단백질로 사용하여 Lowry 등(1951)의 방법이나 Bradford (1976)의 방법으로 실시하였다.

결 과

Calpain의 순수분리 및 항체형성

Calpain은 일반적으로 80 kDa의 catalytic subunit와 30 kDa의 regulatory subunit의 dimer로 알려져 있으나(Pontremoli and Melloni, 1986; Bond and Butler, 1987), chick skeletal muscle에서는 80 kDa의 monomer로 발견된다(Ishiura *et al.*, 1987). 본 실험에서 정제한 calpain도 SDS-PAGE 상에서 80 kDa의 single band로 나타났으며(Fig. 1B), 약 0.7 mM의 Ca^{++}에서 최대 활성도를 나타내는 것으로 보아(data not shown) calpain II (millimolar calpain)임을 알 수 있었다.

정제한 calpain을 토끼에 주사하여 항체를 만든 다음 double immunodiffusion방법(data not shown)과 immunoblot방법(Fig. 5A)으로 이 항체를 검정하였다. 또한 이 항체는 calpain의 활성을 저해시키는 것으로 보아(Fig. 2), calpain에 대한 특이적 항체임을 알 수 있었다.

배양 근원세포의 분화에 따른 Calpain활성의 변화

Fig. 3은 계배 근원세포의 배양시간에 따른 세포의 형태적 변화를 보여주는 현미경 사진이다. 미분화 세포인 근원세포(24시간 세포)가 신장 및 이완을 하고, 배양 48시간부터 세포융합을 시작하여 배양 72시간에는 커다란 근관을 형성함을 볼 수 있었다.

이러한 근원세포를 각 배양 시간별로 수확하여 calpain의 활성을 측정하여 보았다. 배양세포를 0.25 M sucrose와 5 mM EDTA가 들어있는 20

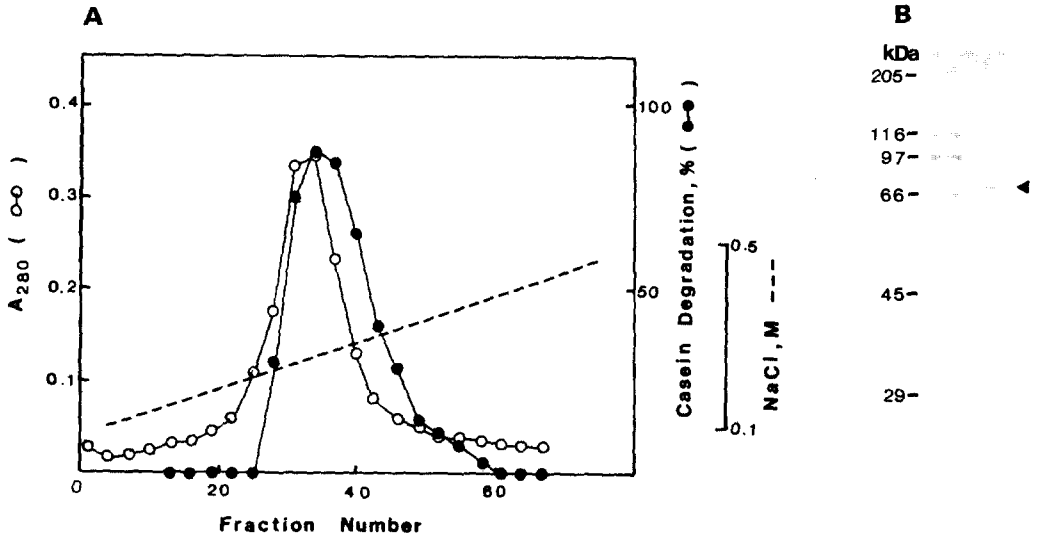

Fig. 1. Second DEAE-cellulose column chromatography of calpain fraction obtained from Ultrogel AcA 34 step. (A). After washing the unabsorbed proteins with buffer B (see text), proteins were eluted with linear gradient of 0.1-0.4 M NaCl. Protein profiles were determined at 280 nm and calpain activity was estimated as described in "Materials and Methods." Panel B shows electrophoretic pattern of the purified calpain obtained from the second DEAE-column.

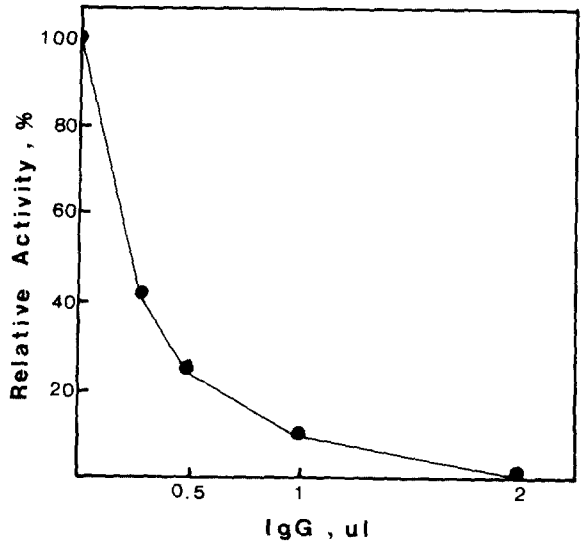

Fig. 2. Inhibitory effect of anti-calpain antibody on the hydrolysis of [^{3}H]-casein by calpain. Purified calpain (0.1 μg) and [^{3}H]-casein were incubated with various amounts of anti-calpain in 15 mM β-mercaptoethanol and 50 mM Tris-HCl (pH 7.8). After incubation at 30°C for 1 hr, the activity of calpain was measured.

mM Tris-HCl 용액(pH 7.4)으로 3번 세척한 다음, rubber policeman으로 세포를 수확하고 균질화하여 단백질 용액을 얻었다. 이와같이 얻은 시료를 미리 준비한 DEAE-컬럼에 부은 다음, 0.15 M NaCl이 들어있는 20 mM Tris-HCl 용액(pH 7.8)을 흘려서 레진에 붙지않은 단백질을 제거하고, 다시 0.4 M NaCl이 들어있는 동일 완충용액으로 calpain을 용출시켰다. Calpain이 포함되어 있는 분획만을 모아서 단백질 정량과 calpain활성도 측정을 실시하여, 각 배양시간에 따른 상대적 활성을 비교한 결과가 Fig. 4이다. 배양시간이 경과할수록 즉, 근원세포의 분화가 진행될수록 calpain의 활성은 증가하였다. 초기의 배양 24시간에 비하여 근원세포융합이 시작되는 배양 48시간에는 약 3배, 세포융합이 지속되고 있는 배양 60시간에는 약 4-5배의 활성증가가 일어났다. 그러나 배양 60시간이후로는 더이상의 활성증가가 일어나지 않고 오히려 약간 감소하는 경향을 보였다.

배양 근원세포의 분화에 따른 Calpain의 양적 변화

배양 근원세포의 분화에 따른 calpain의 양적변

화를 immunoblot방법으로 조사하였다. 배양세포를 Earle's balanced salt solution (EBSS)으로 3번 세척한 다음, 세포를 수확하여 균질화하였다. 이 시료의 단백질을 정량한 다음, SDS-PAGE sampling buffer로 단백질을 가용화시키고 전기영동과 immunoblot을 실시하였다. Fig. 5A에서 볼 수 있는 것처럼 배양 시간이 경과할수록 calpain의 양은 증가하는 것으로 나타났으며, 배양 48시간 이후로는 큰 양적 변화가 일어나지 않고 그 수준을 계속 유지하였다. 즉, calpain은 근원세포의 분화초기인 배양 24시간에서 48시간 사이에서 급격히 그 양적 증가를 보이며, 근소포체 Ca^{++}/Mg^{++}-ATPase의 경우에는 배양시간에 따라서 그 양이 지속적으로 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 5B).

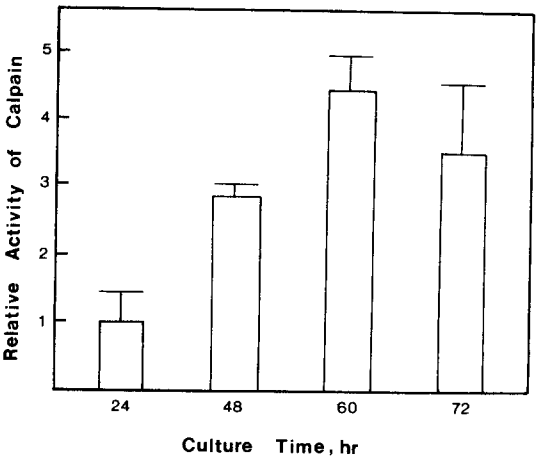

Fig. 4. Changes in the activity of calpain during myogenesis *in vitro*. Cultured cells were harvested and homogenized. Proteins were obtained by centrifuging the cell extract and loaded on DEAE-column equilibrated with 20 mM Tris-HCl (pH 7.8) containing 0.15 M NaCl and 5 mM EDTA. Calpain was then eluted with 0.4 M NaCl in same buffer and assayed for its activity as in Fig. 1. The activity seen in the cell extract of 24 hr culture was expressed as 1.0, and the others were as its relative values.

고 찰

본 실험에서는 calpain의 활성과 그 단백질 양이 근원세포의 분화에 따라 변화하며, recognition-alignment 시기인 배양 48시간(Fig. 3)에 최대치에 이름을 알 수 있었다(Fig. 4, Fig. 5). 그러나 근소포체의 Ca^{++}/Mg^{++}-ATPase같은 근 특이 단백질은 배양 시간이 경과함에 따라 지속적으로 증가하였다(Fig. 5). 따라서, calpain은 적어도 근원세포가 융합을 시작하기 이전에 발현되며, 이는 근원세포의 융합과정에 calpain이 필요하다는 간접적인 증거라고도 할 수 있다.

배양 근원세포의 분화는 단세포인 근원세포가 분열시기를 거친 다음, 근원세포끼리 recognition-alignment 한 후, 세포융합을 하는 뚜렷한 형태적 변화를 겪는다(Fig. 3). 따라서 근원세포가 이러한 형태적 변화를 일으키기 위해서는 세포막의 재구성이 필요하며, 근원세포가 융합하는 동안 막의 유동성의 증가(Prives and Shintzky, 1977), 막 단백질의 변화(Rosenberg *et al.*.

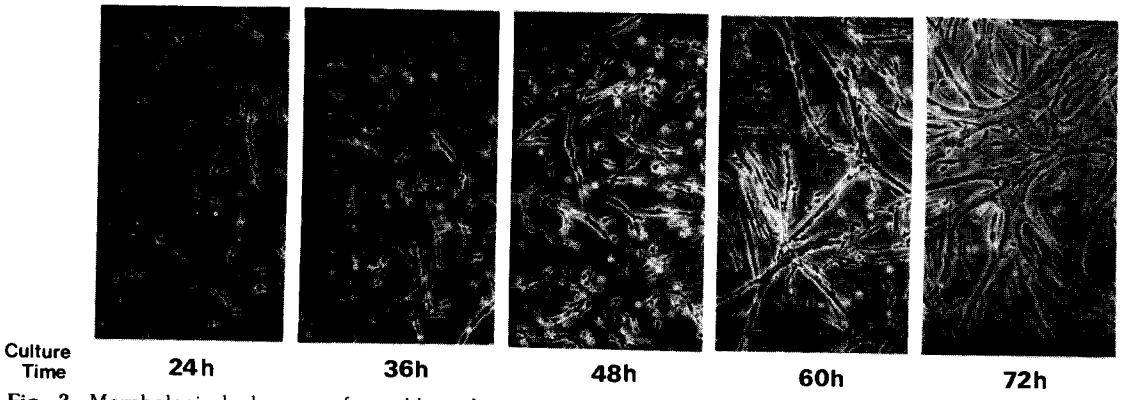

Fig. 3. Morphological changes of myoblasts during myogenesis *in vitro*. At the indicated time of culture, cells were observed and photographed under a phase-contrast microscope.

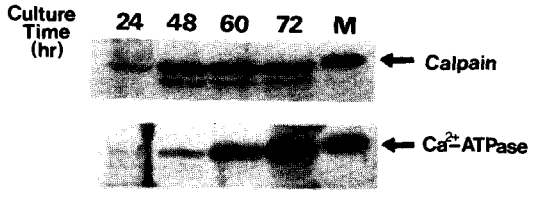

Fig. 5. Changes in the level of calpain (A) and Ca^{2+}-ATPase (B) during myogenesis *in vitro*. At the indicated time of culture, cells were harvested and solubilized with SDS-PAGE sampling buffer. Proteins (100 μg each) were electrophoresed and transferred to nitrocellulose papers. The sheets were then incubated with anti-calpain or anti-Ca^{2+}-ATPase antibodies. After washing the unbound antibodies, the sheets were incubated with ^{125}I-protein A (10^5 cpm/ml) and autoradiographed.

1985), ion에 대한 permeability의 변화(David *et al.*, 1981; Panet *et al.*, 1987; Kwak *et al.*,1989)등 세포막을 중심으로 일련의 변화가 일어나는 것으로 알려져 있다. 또한, 잘 알려진 extracellular matrix의 구성물질인 fibronectin이 근원세포가 융합하는 동안 감소한다고 보고되어 있다(Chen, 1977; Furcht *et al.*, 1978). 이러한 막 단백질이나 세포 표면단백질의 변화에 calpain이 어떠한 역할을 하는 지는 아직 잘 알려져 있지 않다. 그러나 calcium ionophore인 A_{23187}을 근원세포에 처리하면 precocious fusion이 일어날뿐 아니라(David *et al.*, 1981), fibronectin의 감소까지도 유도할 수 있다(Schollmeyer, 1986). 또한, 최근에는 fibronectin receptor와 연결된 단백질인 talin이 calpain II의 기질로 밝혀졌는데(Beckerle *et al.*, 1987), 이는 근원세포의 분화에 따른 fibronectin의 감소에 calpain이 관련되어 있음을 강력히 시사하는 것이다.

한편, 세포막의 재구성에 관련된 calpain의 또 하나의 역할로는 cytoskeletal proteins의 분해라고 할 수 있다. 근원세포는 분화를 하는 동안 세포 골격의 재구성(Fulton *et al.*, 1981) 뿐만 아니라 spectrin isoforms의 전이(Nelson and Lazarides, 1983), intermediate filaments인 vimentin과 desmin의 재구성(Gard and Lazarides, 1980) 등과 같은 세포 골격단백질의 질적 변화도 일어난다고 알려져 있다. 지금까지 근원세포가 분화하는 동안에 calpain이 특정 세포 골격단백질을 분해한다는 보고는 없지만, *in vitro*에서 calpain은 spectrin이나 vimentin과 desmin같은 세포 골격단백질들을 분해한다(Nelson and Traub, 1982; Siman *et al.*, 1984). 따라서, calpain은 이들 골격단백질을 분해하여 근원세포의 융합에 필요한 cytoskeletal protein-membrane linkage의 와해를 일으킨다고도 볼 수 있다.

배양 근원세포의 분화에 calpain이 어떤 역할을 한 것이라는 가정에는 다음과 같은 몇가지 근거가 있다. 1) 근원세포가 융합하기 이전에 Ca^{++}의 유입현상이 일어나는데(David *et al.*, 1981), calpain이 활성화되는데에는 Ca^{++}이 절대적으로 필요하다. 2) EGTA로 배양액 내의 Ca^{++}농도를 낮추면 세포융합이 억제되지만, 반대로 A_{23187}을 이용하여 세포안의 Ca^{++}농도를 높이면 precocious fusion이 일어난다(David *et al.*,1981). 3) Calpain은 근원세포 융합이 일어나기 시작할 무렵 이미 그 발현이 충분히 이루어진 상태이며 (Fig. 4, Fig. 5), 4) 근원세포의 융합이 일어나기 전에 calpain이 세포질에서 세포막쪽으로 이동한다(Schollmeyer, 1986a, b). 5) 근원세포가 융합하는 데에는 protein kinase C의 활성이 필요하며 (Wakelam and Pette, 1982; Lognonne and Wahrmann, 1986), calpain은 protein kinase C를 활성화시킨다는 점(Suzuki *et al.*, 1987)등이다. 따라서, 세포융합과 관련된 calpain의 기능을 구체적으로 알아보기 위하여서는 분화시기에 따른 calpain의 특이적 기질을 찾는 것이 선결과제라 할 수 있다.

인용문헌

Bandry, M. and G. Lynch, 1980. Regulation of hipocampal glutamate receptors: Evidence for the involvement of a calcium-activated protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:2298-2302.

Beckerle, M. C., K. Burridge, G. N. DeMartino, and D. E. Croall, 1987. Co-localization of calcium-dependent protease II and one of its substrates at sites of cell adhesion. *Cell* **51**:569-577.

Blake, M. S., K. H. Johnston, G. J. Russell-Jones, and E. C. Gotschlich, 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* **136**:175-179.

Bond, J. S. and P. E. Butler, 1987. Intracellular proteases. *Ann. Rev. Biochem.* **56**:333-364.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and senstive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

Cassel, D. and L. Glaser, 1982. Proteolytic cleavage of epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **257**:9845-9848.

Chen, L. B., 1977. Alterations in cell surface LETS protein during myogenesis. *Cell* **10**:393-400.

Couch, C. B. and W. J. Strittmatter, 1983. Rat myoblast fusion requires metalloendoprotease activity. *Cell* **32**:257-265.

Couch, C. B. and W. J. Strittmatter, 1984. Specific blockers of myoblast fusion inhibit a soluble and not the membrane-associated metalloendoprotease in myoblasts. *J. Biol. Chem.* **259**:5396-5399.

David, J. D., W. M See and C. A. Higginbotham, 1981. Fusion of chick embryo skeletal myoblasts: Role of calcium influx preceding membrane union. *Dev. Biol.* **82**:297-307.

Dayton, W. R., D. E. Goll, M. G. Zeece, R. M. Robson, and W. J. Reville, 1976. A Ca^{2+}-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry* **15**:2150-2158.

Devlin, R. B. and C. P. Emerson Jr., 1978. Coordinate regulation of contractile protein synthesis during myoblast differentiation. *Cell* **13**:599-611.

Farzin, F., A. Entwistle, and R. J. Zalin, 1989. Protein kinase C mediates the hormonally regulated plasma membrane fusion of avian embryonic skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* **181**:298-304.

Fulton, A. B., J. Prives, S. R. Farmer, and S. Penman, 1981. Developmental reorganization of the skeletal framework and its surface lamina in fusing muscle cells. *J. Cell Biol.* **91**:103-112.

Furcht, L. T., D. F. Mosher, and G. Wendelshafer-Crabb, 1978. Immunocytochemical localization of fibronectin (LETS protein) on the surface of L_6 myoblasts: Light and electron microscopic studies. *Cell* **13**:263-271.

Gard, D. L. and E. Lazarides, 1980. The synthesis and distribution of desmin and vimentin during myogenesis *in vitro*. *Cell* **19**:263-275.

Ishiura, S., H. Murofushi, K. Suzuki, and K. Imahori, 1978. Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle. *J. Biochem.* **84**:225-230.

Ishiura, S, 1981. Calcium-dependent proteolysis in living cells. *Life Sci.* **29**:1079-1087.

Ito, M., T. Tanaka, K. Nunoki, H. Hidaka, and K. Suzuki, 1987. The Ca^{2+}-activated protease (calpain) modulates Ca^{2+}/calmodulin dependent activity of smooth muscle myosin light chain kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**:1321-1328.

James, P., T. Vorherr, J. Krebs, A. Morelli, G. Castello, D. J. McCormick, J. T. Penniston, A. DeFlora, and E. Carafoli, 1980. Modulation of erythrocyte Ca^{2+}-ATPase by selective calpain cleavage of the calmodulin-binding domain. *J. Biol. Chem.* **264**:8289-8296.

Kwak, K. B., Y. S. Lee, S. W. Suh, C. S. Chung, D. B. Ha, and C. H. Chung, 1989. Purothionin from wheat endosperm reversibly blocks myogenic differentiation of chick embryonic muscle cells in culture. *Exp. Cell Res.* **183**:501-507.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

Lognonne, J. L. and J. P. Wahrmann, 1986. Spontaneous myoblast fusion is mediated by cell surface Ca^{2+}-dependent protein kinase(s). *Exp. Cell Res.* **166**:340-356.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.

Melloni, E., S. Pontremoli, M. Michetti, O. Sacco, B. Sparatore, and B. L. Horecker, 1986. The involvment of calpain in the activation of protein kinase C in neutrophile stimulated by phorbol myristic acid. *J. Biol. Chem.* **261**:4101-4105.

Nelson, W. J. and E. Lazarides, 1983. Switching of subunit composition of muscle spectrin during myogenesis *in vitro*. *Nature* 304:364-368.

Nelson, W. J. and P. Traub, 1982. Purification and further characterization of the Ca^{2+}-activated proteinase specific for the intermediate filament proteins vimentin and desmin. *J. Biol. Chem.* **257**:5544-5553.

Okazaki, K. and H. Holtzer, 1966. Myogenesis: Fusion, myosin synthesis, and the mitotic cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**:1484-1490.

O'Neill M. C. and F. E. Stockdale, 1972. A kinetic analysis of myogenesis *in vitro*. *J. Cell Biol.* **52**:52-65.

Panet, R., D. M. Digregorio, and R. H. Brown Jr., 1987. Irreversible reduction in potassium fluxes accompanies teminal differentiation of human myoblasts to myotubes. *J. Cell. Physiol.* **132**:57-64.

Pontremoli, S. and E. Melloni, 1986. Extralysosomal protein degradation. *Ann. Rev. Biochem.* **55**:455-481.

Prives, J and M. Shinitzky, 1977. Increased membrane fluidity precedes fusion of muscle cells. *Nature* **268**:761-763.

Rosenberg, J., A. Szabo, D. Rheuark, and C. Kayalar, 1985. Correlation between fusion and the developmental regulation of membrane glycoproteins in L_6 myoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:8409-8413.

Schollmeyer, J. E., 1986a. Role of Ca^{2+} and Ca^{2+}-activated protease in myoblast fusion. *Exp. Cell Res.* **162**:411-422.

Schollmeyer, J. E., 1986b. Possible role of calpain I and calpain II in differentiating muscle. *Exp. Cell Res.* **163**:413-422.

Shainberg, A., G. Yagil, and D. Yaffe, 1969. Control of myogenesis *in vitro* by Ca^{2+} concentration in nutritional medium. *Exp. Cell Res.* **58**:163-167.

Siman, R., M. Baudry, and G. Lynch, 1984. Brain fodrin: substrate for calpain I, and endogeneous calcium-activated protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:3572-3576.

Suzuki, K., S. Imajoh, Y. Emori, H. Kawasaki, Y. Minami, and S. Ohno, 1987. Calcium-activated neutral protease and its endogeneous inhibitor: Activation at the cell membrane and biological fuction. *FEBS Letters* **220**:271-277.

Wakelam M. J. and Pette, 1982. The breakdown of phosphatidylinositol in myoblasts stimulated to fuse by the addition of Ca^{2+}. *Biochem. J.* **202**:723-729.

Yoshida, H., T. Murachi and I. Tsukahara, 1984. Degradation of actin and vimentin by calpain II, a Ca^{2+}-dependent cysteine proteinase, in bovine lens. *FEBS Letters* **170**:259-262.

(Accepted February 20, 1990)

Alterations in the Level of Calpain During the Differentiation of Chick Embryonic Muscle Cells in Culture

Kyu Bong Kwak, Sung Soo Chung, Hye-Gyeong Park, Hye Sun Kim, Chin Ha Chung and Doo Bong Ha (Department of Zoology, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

Proteolytic activity of calpain was found to increase as myoblast fusion proceeds. At 60 hr after cell seeding, its activity reached to a maximal level and then slightly decreased thereafter. Similarly, the protein level of calpain reached to a maximal level just proir to the initiation of fusion and remained elevated upon prolonged culture as analyzed by immunoblot using anti-calpain antiserum. These results suggest that the synthesis of calpain is regulated during myogenesis and its proteolytic activity may be related with the process of myoblasts fusion.